

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-146189

(43)公開日 平成10年(1998)8月2日

(51)Int.Cl.*	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/27	A D T	C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 H 21/04		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02		A 6 1 K 37/36	A D T
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平8-304942

(22)出願日 平成8年(1996)11月15日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年7月19日
日本骨代謝学会開催の「第14回日本骨代謝学会」において文書をもって発表

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 関 祐司

大阪府河内長野市千代田南町23-23

(72)発明者 高橋 和展

神奈川県横浜市青葉区鶴志田町1000番地

三菱化学株式会社横浜総合研究所内

(72)発明者 上園 昭人

神奈川県横浜市青葉区鶴志田町1000番地

三菱化学株式会社横浜総合研究所内

(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な遺伝子およびそれを用いた組換えタンパク質の製造方法

(57)【要約】

【課題】 様々な骨、軟骨疾患に対し効果が期待される
コンドロモジュリン-Ⅱタンパク質をコードするDNA
Aを提供する。

【解決手段】 下記の理化学的性質を有することを特徴
とするコンドロモジュリン-Ⅱタンパク質をコードす
るDNA。

(1) 1種のポリペプチドから構成される水溶性タンバ
ク質であってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
による分子量が約16KDである。

(2) 破骨細胞を単独または他の細胞増殖因子共存下
において増殖させる活性を有する。

(3) 軟骨細胞に対し分化機能を促進させる活性を有す
る。

(4) 軟骨細胞を単独または他の細胞増殖因子共存下
において増殖させる活性を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有することを特徴とするコンドロモジュリン-ⅠⅠタンパク質をコードするDNA。

(1) 1種のポリペプチドから構成される水溶性タンパク質であってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約16KDである。

(2) 破骨細胞を単独または他の細胞増殖因子共存下において増殖させる活性を有する。

(3) 軟骨細胞に対し分化機能を促進させる活性を有する。

(4) 軟骨細胞を単独または他の細胞増殖因子共存下において増殖させる活性を有する。

【請求項2】 前記コンドロモジュリン-ⅠⅠタンパク質が、下記(A)又は(B)に示すタンパク質であることを特徴とする請求項1記載のDNA。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち、少なくともアミノ酸番号1~133からなるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列のうち、少なくともアミノ酸番号1~133からなるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、前記(1)~(4)に記載の性質を有するタンパク質。

【請求項3】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項2記載のDNA。

(a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号187~585からなる塩基配列を有するDNA。

(b) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号187~585からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項4】 請求項1~3のいずれか一項に記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項5】 請求項1~3のいずれか一項に記載のDNAを含み、かつ、コンドロモジュリン-ⅠⅠタンパク質の一部又は全部を発現し得る形質転換体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体を培地で培養し、その培養物からコンドロモジュリン-ⅠⅠタンパク質の一部または全部を採取することを特徴とする、コンドロモジュリン-ⅠⅠタンパク質の一部または全部を製造する方法。

【請求項7】 請求項1記載のDNAによりコードされるコンドロモジュリン-ⅠⅠタンパク質の一部または全部を有効成分とする医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、軟骨細胞増殖活性を有するタンパク質（以下、該タンパク質を「ChM-

ⅠⅠタンパク質」または「コンドロモジュリン-ⅠⅠタンパク質」あるいは単に「ChM-ⅠⅠ」または「コンドロモジュリン-ⅠⅠ」と略記することがある。またコンドロモジュリンを単に「ChM」と略記することがある）をコードするDNA（以下、「ChM-ⅠⅠ遺伝子」と略記することがある）、該遺伝子を含有してなる発現ベクター、該発現ベクターで形質転換された形質転換体、および、該形質転換体を用いたコンドロモジュリン-ⅠⅠの産生方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 哺乳類の大部分の骨（頭蓋骨等の平板な骨は除く）は胎児期にまず軟骨原基が出現した後、軟骨細胞の増殖と分化、プロテオグリカンや2型、9型、10型コラーゲン等の軟骨原基の産生を経て、毛細血管の侵入と共に軟骨原基が分解して、基質小胞を中心とする石灰化が始まり、最後は骨に置換する、いわゆる「軟骨性骨化」という仕組みによって作られる。従って軟骨代謝は骨の形成、特に長軸方向への伸長において非常に重要な役割を演じている。

【0003】 この一連の過程において種々のホルモンや成長因子が関与している。この中にはインスリン様増殖因子（IGF1、IGF2）、繊維芽細胞増殖因子（FGF）、癌細胞増殖因子（TGF）、成長ホルモンなどが含まれる。これらの他に軟骨細胞の増殖、分化機能の促進作用を有する因子が軟骨中に存在する事が知られていた。例えば、コンドロモジュリン-Ⅰ（ChM-Ⅰ）は、軟骨細胞のプロテオグリカン合成を促進し、DNA合成能を高める作用を有していることが知られている。

【0004】 骨折の治癒、各種軟骨疾患の治癒過程においては軟骨細胞の増殖、分化機能の発現が重要である。骨折治癒過程においては、骨折部位における炎症反応、骨膜由来細胞の増殖に続き、軟骨細胞が出現、増殖し、軟骨細胞外基質を合成した後に、石灰化し、骨組織に置換されて骨折治癒が完成する。すなわち軟骨破壊、損傷を伴う軟骨疾患からの回復過程においては軟骨細胞の増殖が重要である事は明白である。

【0005】 Peter J. Neameら [The Journal of Biological Chemistry, Vol.265, No.17, 9628-9633(1990)] は、牛軟骨より軟骨中に存在する構成タンパク質を同定する目的でChM-Ⅰと極めて類似したアミノ酸配列を持つ糖タンパク質を分離した。しかし彼らはこのタンパク質の生物学的機能の解明には至っていない。

【0006】 本発明者らは先に、牛軟骨より作成したcDNAライブラリーより牛ChM-Ⅰ遺伝子をクローニングし、動物細胞で発現させた。発現された組換え牛ChM-Ⅰは、精製された牛ChM-Ⅰと同等の活性がある事が報告されている（欧州公開特許第473080号公報）。

【0007】 さらに本発明者らは、牛ChM-Ⅰを、よ

り抗原性の低いものに作り換え、適用するためにヒトChM-I遺伝子を単離し、組み換えタンパク質を取得することにも成功した(特開平7-138295)。

【0008】一方、本発明者らは、牛軟骨よりChM-Iを単離する際に、逆相HPLCで分画する前段階の試料に、ChM-Iと同様な活性を有する別の因子の存在を確認し、これを別に単離同定した。そしてこの因子をChM-IIと命名し、そのアミノ酸配列の全構造を決定した(特開平5-255398)。その活性は、軟骨細胞のプロテオグリカン合成を促進させること、DNA合成能を高めることに関してはChM-Iと変わらなかった。しかし、ChM-IIは血管内皮細胞の増殖阻害活性を有していない点でChM-Iと異なっていた。またChM-IIは破骨細胞に対する増殖活性をも有することが判明した。これらChM-IIタンパク質の性質は様々な骨、軟骨疾患に対し効果が期待されるところであるが、ChM-IIタンパク質を軟骨から商業的に単離精製する事は困難を伴い、大量かつ安価な生産手段の確立が望まれた。

【0009】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは、ChM-IIを組換えDNA技術により大量に生産させるべく鋭意検討を重ね、かかる目的に有用な新規なChM-IIをコードする遺伝子を初めて分離取得し、さらにこの遺伝子を発現ベクターに組み込み形質転換体を得て、その形質転換体により軟骨細胞増殖因子タンパク質を大量に生産させることに成功し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち、本発明の要旨は、下記の理化学的性質を有することを特徴とするコンドロモジュリン-Iタンパク質をコードするDNAに存する。

(1) 1種のポリペプチドから構成される水溶性タンパク質であってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約16KDである。

(2) 破骨細胞を単独または他の細胞増殖因子共存下において増殖させる活性を有する。

(3) 軟骨細胞に対し分化機能を促進させる活性を有する。

(4) 軟骨細胞を単独または他の細胞増殖因子共存下において増殖させる活性を有する。

【0011】上記DNAとして具体的には、前記コンドロモジュリン-Iタンパク質が、下記(A)又は(B)に示すタンパク質であるDNAが挙げられる。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列のうち、少なくともアミノ酸番号1~133からなるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列のうち、少なくともアミノ酸番号1~133からなるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、前記

(1)~(4)に記載の性質を有するタンパク質。

【0012】上記DNAとしてさらに具体的には、下記(a)又は(b)に示すDNAが挙げられる。

(a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号187~585からなる塩基配列を有するDNA。

(b) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号187~585からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0013】また本発明は、上記DNAを含有する組換えベクター、上記DNAを含み、かつ、コンドロモジュリン-Iタンパク質の一部又は全部を発現し得る形質転換体、上記形質転換体を培地で培養し、その培養物からコンドロモジュリン-Iタンパク質の一部または全部を採取することを特徴とする、コンドロモジュリン-Iタンパク質の一部または全部を製造する方法、及び上記DNAによりコードされるコンドロモジュリン-Iタンパク質の一部または全部を有効成分とする医薬組成物を提供する。

【0014】

【発明の実施の形態】以下本発明につき詳細に説明する。本発明のDNAがコードするタンパク質ChM-Iは、特開平5-255398号公報に記載されているように、以下のような理化学的性質を有するものである。

(1) 1種のポリペプチドから構成される水溶性タンパク質であってSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)による分子量が約16KDである。

(2) 破骨細胞を単独または他の細胞増殖因子共存下において増殖させる活性を有する。

(3) 軟骨細胞に対し分化機能を促進させる活性を有する。

(4) 軟骨細胞を単独または他の細胞増殖因子共存下において増殖させる活性を有する。

【0015】ChM-Iタンパク質は、配列表の配列番号2においてアミノ酸番号1~133で表されるアミノ酸配列を有する。本発明のDNAによってコードされるChM-Iには、上記アミノ酸配列において、軟骨細胞を増殖させる活性および軟骨細胞の分化機能を促進する活性、さらに破骨細胞の増殖を促進する活性を損なわない範囲で、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものも含まれる。

【0016】本発明のDNAは、上記(1)~(4)に示す理化学的性質を有するChM-Iタンパク質をコードするものであり、具体的には、配列番号2においてアミノ酸番号1~133で表されるアミノ酸配列をコードするDNAが挙げられる。本発明のDNAは、この配

列を有するものに限られず、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードするものは全て含まれる。さらに具体的には、例えば、配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号187～585で表される塩基配列を有するものが挙げられる。なお、配列表の配列番号1に示す塩基配列は他の相補的な塩基配列を省略して一本鎖のみを記載した。

【0017】また、コードするChM-Ⅱの活性を損なわない範囲で、配列番号2に示すアミノ酸配列のうち、少なくともアミノ酸番号1～133からなるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードするDNAも、本発明に含まれる。このようなDNAの一態様として、例えば、配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号187～585からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ、上記(1)～

(4)に示す理化学的性質を有するChM-Ⅱタンパク質をコードするDNAが挙げられる。

【0018】本発明のDNAを用い、遺伝子組換え技術を利用して例えば配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するChM-Ⅱタンパク質を発現することができる。尚、ChM-Ⅱタンパク質は、生体内ではシグナル配列を含む前駆体として合成され、細胞から分泌される際にはシグナル配列が切断されて、成熟タンパク質が産生される。配列番号2に示すアミノ酸配列は、前駆体のアミノ酸配列であり、アミノ酸番号-15～-1がシグナル配列に相当し、1～133が成熟タンパク質に相当する。

【0019】本発明のDNAを利用してChM-Ⅱタンパク質を発現させる場合には、成熟タンパク質を直接発現させてもよく、シグナル配列を含む前駆体として発現させてもよい。その際、シグナル配列としてChM-Ⅱタンパク質固有のシグナル配列を用いてもよく、また、他のタンパク質のシグナル配列を利用してChM-Ⅱタンパク質を産生させることも可能であり、この1例が配列表の配列番号3に示すアミノ酸配列である。すなわち本発明のChM-ⅡをコードするDNAは、例えば、配列表の配列番号1の他に、発現効率を向上させるアミノ酸配列、例えば、いわゆるシグナル配列に置き換えた物あるいは発現を確認するために他のタンパク質と読み枠が変わらないようにつけた、いわゆるフュージョンタンパク質として設計された物をコードするDNAも含まれる。

【0020】本発明においては、以下に示すような方法で、上記DNA又はその一部を含有してなる発現ベクターを作製し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換させ、該形質転換体を培地で培養し、その培養物からChM-Ⅱタンパク質の一部または全部を採取することにより、ChM-Ⅱタンパク質の一部または全部(以

下、単に「組換えChM-Ⅱということがある」)を得ることができる。

【0021】本発明のChM-ⅡをコードするDNAは、例えば、次のような方法によって得られる。まず本発明のChM-ⅡをコードするDNAを含有するDNAライブラリーとしては、正常牛軟骨あるいは牛胎児全体から調製してきたRNAを用いて公知の常法により作成したプラスミドcDNAライブラリーもしくはファージcDNAライブラリーもしくはファージゲノミックライブラリーが利用できる。

【0022】例えば、ファージcDNAライブラリーの場合、まず牛軟骨などの組織、あるいは牛胎児全組織を液体窒素中で粉砕しグアニジンイソチオシアネート水溶液等中でホモジナイズし、Chirgwinらの方法[Biochemistry Vol.18, 5294-5299(1979)]に従って塩化セシウム平衡密度勾配遠心法によって全RNAを沈澱として分離する。RNAの分離には市販のRNAzol(TelTest社)などの抽出試薬を使用することもできる。分離後、フェノール抽出、エタノール沈澱により全RNAを精製し、これをオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーにかけて精製して目的の牛ChM-Ⅱタンパク質のmRNAを含むポリ(A)含有mRNA(poly(A)⁺mRNA)を単離しmRNA群を得ることができる。

【0023】次に、上記で調製したmRNA群と、例えば、デオキシシチジンが12個から18個つながったいわゆるオリゴ(dT)配列そのもの、あるいは[Nature Vol.329, 836-838(1987)]に記載されているようなオリゴ(dT)配列を含有するような合成DNAにより構成されるプライマーDNAをハイブリダイズさせ、逆転写酵素により1本鎖cDNAを合成する。市販のcDNAの合成キットにもこれに類する配列が利用されている。例えばClontech社のMarathon[™] cDNA Amplification kitの例では配列番号8で表されるDNAにより構成されるプライマーDNAを利用しており、これを用いてcDNAの合成を行うこともできる。その際、後述するPCR反応にはその市販のプライマーに対するPCR反応用の合成DNAが添付されているのでそれを用いてPCR反応を行えば良い。また、前述の[Nature Vol.329, 836-838(1987)]に記載されているようなプライマーDNAを用いる場合にはその配列に相補的な配列を設計し、PCR反応用のプライマーとしてあらかじめ用意しておくとも良い。次に大腸菌のDNAポリメラーゼⅠ、大腸菌のDNAリガーゼ、RNAse Hを用い常法に従い2本鎖cDNAを合成する。次いで、T4 DNAポリメラーゼによりcDNAの末端を平滑化した後、いわゆるEcoRIアダプター等の、制限酵素により切断された形をなすDNAの小断片をT4 DNAリガーゼによりcDNA鎖の両末端に付加する。

【0024】この際、例えばEcoRIメチレーズ等の

10

20

30

40

50

DNAメチレーズでcDNA中の制限酵素切断点を、具体的にはEcoRIメチレーズの場合はEcoRI切断点をメチル化し、制限酵素EcoRIの切断からcDNAを保護しておき、次にcDNAの末端に、いわゆるEcoRIリンカー等をT4DNAリガーゼにより付加した後、制限酵素EcoRIでリンカーDNA部分のみを切断しても同様な結果が得られる。ベクターのクローニングサイトを例えばBamHIなどの他の制限酵素の切断点を選択する場合は前述の一連の末端処理の操作を、例えばBamHIアダプターの結合もしくはBamHIメチレーズ、BamHIリンカー、BamHI等の組み合わせによる処理にする事により同様な結果を得ることができる。

【0025】また、前述のMarathon™ cDNA Amplification kitの場合cDNA末端にベクターの配列と相補的な配列を導入したり、PCR反応を行えるように工夫されたアンカーDNAを添付してあるのでそれを用いて、適切なベクターにcDNAを挿入したり、PCR反応で増幅したりすることもできる。

【0026】上記の様に末端処理されたcDNA鎖を市販のλファージベクター、例えばλZAP (PromegaBiotech社)等のλファージベクターまたはpGEM2 (PromegaBiotech社)等のプラスミドベクターのEcoRI切断部位に常法に従い挿入して組換えλファージDNA群または組換えプラスミドDNA群を得る。あるいはMarathon™ cDNA Amplification kitの場合はメーカーが推奨するベクターとつなぐことにより効率よく組み換え体を得ることができる。あるいはPCR反応で断片を取得する場合はPCR反応により増幅されたDNAの断片がその末端に特異的にAが付加されるために、それに相補的にTを付加したベクター、例えばpCRII (Invitrogen社)やpT7 (Novagen社)などのベクターを用いることによりできる。

【0027】このようにして得られた組換えλファージDNA群を材料とし、市販の例えばギガバック・ゴールド (プロメガ・バイオテック社)などのイン・ヒトロ・パッケージング・キットを説明書に従い使用し、いわゆるイン・ヒトロ・パッケージングを行い、組換えλファージDNAを有するλファージ粒子を得ることが出来る。得られたλファージ粒子を常法、例えばT. Maniatisらの方法 (『MolecularCloning』 Cold Spring Harbor Laboratories刊 1982年)に従い、宿主、例えば、大腸菌に形質導入し、増殖させることによりファージcDNAライブラリーを作ることが出来る。また、組換えプラスミドDNA群では常法に従い、宿主、例えば、大腸菌を形質転換し、増殖させる。これにより、プラスミドcDNAライブラリーを得ることができる。

【0028】牛ChM-1タンパク質の配列 (特開平5-255398号公報参照)を基にPCRプライマーを設計し、いわゆるPCR法にて牛ChM-1遺伝子

の一部を取得することもできる。その場合PCR法に用いる鑄型には前述のファージcDNAライブラリー、プラスミドcDNAライブラリーの他に牛軟骨細胞より抽出したRNAを基に常法に従い合成したcDNAを直接用いることもできる。PCR反応の反応後、反応液をアガロースやポリアクリルアミドゲルで解析し、二種類のプライマーにより増幅されるDNA断片の中から、予想される大きさの断片を回収、精製し、市販の、例えばpCRIIの様なPCR断片を直接組み込むことが出来るベクターにつなぎ、大腸菌を形質転換することにより塩基配列の解析に供することができる。さらに、得られたChM-1遺伝子の部分配列を基に新たにPCRプライマーを設計、合成し、これと、牛ChM-1の配列を基に設計したPCRプライマー、あるいはcDNAを合成する際に用いるプライマーに対して相補的な配列のプライマー、またはcDNAの両端に付加したアンカー配列に対応するPCR用プライマー、cDNAが組み込まれたベクターに対するプライマーとの間でDNAの増幅を繰り返し行うことによりChM-1の全長をコードする遺伝子を取得することもできる。

【0029】また、ファージcDNAライブラリー、プラスミドcDNAライブラリーを常法に従い、適当な宿主、例えば、大腸菌を形質転換し、増殖させる。次に、これらファージあるいは大腸菌を、例えばジーンスクリーニングプラス (Dupon社)などのナイロン膜あるいはニトロセルロース膜上に移し取り、アルカリ存在下で蛋白を除き、λファージDNAあるいはプラスミドDNAにしたものに対して、前述の方法で増幅されたChM遺伝子の部分断片から常法に従い、あるいは市販のキット等により作製した[³²P]標識プローブとこれらcDNAクローンのDNA群とをハイブリダイズさせブランクハイブリダイゼーション法によって選択し、目的とする牛ChM遺伝子をコードするcDNAクローンをその全部または一部得ることもできる。

【0030】PCR反応の反応後、DNAの断片はアガロースやポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により解析、回収、精製し、前述の例えばpCRIIの様なPCR断片を直接組み込むことが出来るベクターに挿入後に大腸菌を形質転換し、常法に従いDNAを調製し、Sangerらのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 74, 5463 (1977)] によって目的DNA断片の塩基配列が決定できる。配列の決定はABI373A (アプライド・バイオ・システムズ社)の様な自動シーケンサーによって行うこともできる。

【0031】また、ファージライブラリーやプラスミドライブラリーから得られたクローンの場合、自動シーケンサーが塩基配列を決定できる長さには限界があるため、ベクターに挿入されたcDNAの全領域を一度に解析することは難しい。そこで、断片を適当な制限酵素で切断し、ゲル電気泳動で分離、回収し、回収された断片

10

20

30

40

50

を然るべきベクターに挿入し直すことにより解析を容易にすることができる。このような操作をサブクローニングと呼ぶが、サブクローニング以外にも、自動シーケンサーが決定した塩基配列の中から適当な配列を選び、新たなプライマーを設計し、そこから先を継続して解析する事ができる。このようにして決定されるDNA断片の配列を互いに重なるように、かつ、コード領域の全長をカバーするようにつなぎ合わせる事により、151個のアミノ酸からなるChM-ⅠⅠ前駆体タンパク質をコードするDNAが得られる。前述したように、本発明のDNAを利用してChM-ⅠⅠタンパク質を発現させる場合には、この前駆体タンパク質を発現させてもよく、133アミノ酸からなる成熟タンパク質を直接発現させてもよい。

【0032】さらに、本発明によるDNA断片は配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列をコードするものに限らず、軟骨細胞を増殖させる活性および軟骨細胞の分化機能を促進する活性、さらに破骨細胞の増殖を促進する活性を持つ限りは、そのアミノ酸配列を改変したものも含まれる。そのような改変されたDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されるように本発明のDNAの塩基配列を改変することによって得られる。

【0033】また、本発明のDNA又はこれを有する細胞に変異処理を行い、これらのDNA若しくは細胞又は自然突然変異株若しくは変種から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号187～585からなる塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することによっても、改変されたDNAを得ることができる。ここでいう「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い核酸同士、例えば70%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。

【0034】上記のようにして得られる、特定の部位又は未知の部位が変異した改変DNA断片を、適当な細胞で発現させ、その発現産物について、軟骨細胞を増殖させる活性、軟骨細胞の分化機能を促進する活性、及び破骨細胞の増殖を促進する活性を調べ、これらの活性を有するタンパク質をコードするDNAを選択することにより、目的のDNAを取得することができる。

【0035】上記のようにして得られる、ChM-ⅠⅠ蛋白の一部または全部をコードするDNA断片は、その両端あるいはどちらかの末端を改変し、またはそのまま、公知の発現ベクターにそれ自体公知の方法でプロモーターの下流に挿入され、次いで上記のDNAが挿入された発現ベクターは、大腸菌、酵母、動物細胞宿主等、

公知の宿主細胞中にそれ自体公知の方法により導入される。

【0036】本発明のChM-ⅠⅠタンパク質の産生方法につき詳細に説明すると、発現ベクターとしては上記のようにして得られたChM-ⅠⅠタンパク質をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが使用される。

【0037】ChM-ⅠⅠの工業生産のためには、安定した宿主-ベクター系を構築すること、さらに生物学的に活性の有するChM-ⅠⅠを発現しうる系を用いる必要がある。ChM-ⅠⅠは多くのシステインを含み、そのリフォールディングが生理活性の獲得に重要である。一般的にはリフォールディングを考慮した場合、宿主としては動物細胞を用いることが多い。しかし、天然のChM-ⅠⅠは糖蛋白質ではないこと、また生産量の優位性から、生理活性を確保できるのであれば大腸菌での生産も可能である。大腸菌での生産については、後述の実施例で具体的に説明する。

【0038】動物細胞としては、例えばCHO細胞、COS細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞等が挙げられる。またこれらの細胞を宿主とする場合は、前駆体タンパク質の形でChM-ⅠⅠ遺伝子を導入することにより、成熟型になったChM-ⅠⅠが分泌生産されるという利点が期待される。

【0039】これらの細胞を宿主とした発現用プラスミドは、プロモーターとしてはSV40プロモーターまたはメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが好ましい。この下流にシグナル配列を含むChM-ⅠⅠ遺伝子を5'側から挿入する。またChM-ⅠⅠの生産量を上げるためChM-ⅠⅠ遺伝子を5'側から2～3個つなげたものを挿入してもよいし、各ChM-ⅠⅠ遺伝子の5'側にSV40などのプロモーターを挿入したものを2～3個つなげてよい。このChM-ⅠⅠ遺伝子の下流にはポリアデニル化部位が含まれる。例えばSV40 DNA、β-グロビン遺伝子またはメタロチオネイン遺伝子由来のものが上げられる。

【0040】この発現ベクターには動物細胞、例えばCHO細胞に形質転換した際の選択マーカーを有している場合とそうでない場合の両者があげられる。選択マーカーとしては、メトトレキセート耐性を与えるDHFR遺伝子、3'-デオキシストレプタミン抗生物質G-418などが挙げられ、各耐性遺伝子の5'側には例えばSV40由来のプロモーターが挿入されており、各耐性遺伝子の3'側には、ポリアデニル化部位が含まれる。ChM-ⅠⅠの発現ベクターにこれらの耐性遺伝子を挿入する場合、ChM-ⅠⅠ遺伝子のポリアデニル化部位下流に挿入すればよい。かかる発現ベクターは、形質転換体の選択マーカーがなくてもよい。この場合、ChM-ⅠⅠの発現ベクターと共に形質転換体の選択のマーカーを有するベクター、例えばpSV2neo、pSV2g

p t、pMTVdhfrなどを二重形質転換してやればよい。

【0041】この二重形質転換法によってChM-ⅠⅠ発現ベクターで形質転換した動物細胞を選択するためには、上記した選択マーカーの発現による表現形質により、ChM-ⅠⅠ形質転換細胞を選択することが可能である。さらにChM-ⅠⅠの発現量の上昇を目的として、二重形質転換法にてChM-ⅠⅠの発現が確認された細胞に対し、選択マーカーを変更し二重形質転換を繰り返してもよい。発現ベクターに使用されるプラスミドベクターの具体例としては、SV40初期プロモーター、ウサギのβ-グロビン遺伝子に由来するスプライス配列DNA、ウサギのβ-グロビン遺伝子からのポリアダニ化部位、SV40初期領域からのポリアダニ化部位、並びにpBR322由来の複製開始点およびアンピシリン耐性遺伝子を含有するpKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.78, 1528(1981))などが挙げられる。

【0042】発現ベクターの動物細胞への移入はリン酸カルシウムによるトランスフェクション法が一般的である。形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または付着培養で行うことができる。培地としては、MEM、RPMI1640などを用い、5~10%血清存在下もしくは適量のインシュリン、デキサメサゾン、トランスフェリンの存在下、もしくは無血清下にて培養する。ChM-ⅠⅠを発現している動物細胞はその培養上清中にChM-ⅠⅠを分泌するものと考えられ、かかる組換え体の培養上清を用いChM-ⅠⅠの分離精製を行うことが可能である。生産されたChM-ⅠⅠを含む培養上清は各種クロマトグラフィー例えば、ヘパリンセファロースもしくはブルーセファロース等を用いたクロマトグラフィーにより精製可能である。

【0043】また大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主とするときには、発現ベクターはプロモーター、リボゾーム結合(SD)配列、ChM-ⅠⅠタンパク質遺伝子、転写終結配列、およびプロモーターを制御する遺伝子より成ることが好ましい。

【0044】プロモーターとしては、大腸菌、ファージ等由来のもの、例えばトリプトファン合成酵素(trp)、ラクトースオペロン(lac)、ラムダファージPL、PR、T5ファージの初期遺伝子のプロモーターであるP25、P26プロモーター等が挙げられる。また、これらのプロモーターは、例えばpacプロモーター [Agric. Biol. Chem., Vol.52, 983-988(1988)] のように独自に改変、設計された配列でも良い。

【0045】リボゾーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでも良いが、DNA合成により作成した16SリボゾームRNAの3'末端領域に相補的な配列を4塩基以上連続してもつコンセンサス配列を持ったものでも良い。転写終結配列は必ずしも必要ではない

が、ρ非依存性のもの、例えばリボプロテインターミネーター、trpオペロンターミネーター等を有している方が好ましい。

【0046】更にこれらの発現に必要な因子の発現プラスミド上での配列順序は、5'上流から、プロモーター、SD配列、ChM-ⅠⅠタンパク質遺伝子、転写終結因子の順に並ぶ事が望ましい。また発現ベクター上のSD配列とChM-ⅠⅠタンパク質遺伝子とのユニットを複数個同方向に挿入することにより、ベクター上の転写単位のコピー数を増加させる方法(特開平1-95798号公報)を用いることもできる。

【0047】組換え蛋白の大腸菌からの回収、精製を容易にするために種々のアフィニティークラムを利用することもできる。例えばヒスチジンが6個以上並んだアミノ酸配列、いわゆるヒスチジntagを有する蛋白質がキレートカラムに結合する性質を利用し、プロモーターの下流にこのヒスチジンが6個以上並んだアミノ酸配列を置き、その下流にChM-ⅠⅠをつなぐことにより蛋白の発現後キレートカラムにより容易に精製が可能となる。さらにヒスチジン配列とChM-ⅠⅠの配列の間に、例えばTEVプロテアーゼや第10因子により特異的に切断される配列を組み込むことによりキレートカラム精製後に蛋白質を天然型と同じ配列に戻し回収することができる。プロテアーゼによる切断後はHPLC等により分離、精製することができる。

【0048】発現ベクターとして使用できるものとしては、pUA12(特開平1-95798号公報)や市販のpKK233-2(Pharmacia社)等がある。また、融合蛋白として発現させる発現ベクターpGEXシリーズ(Pharmacia社)、ヒスチジン配列を利用した精製が可能ベクターとしてはpPROEX-Ⅰが同様にして使用できる。宿主の形質転換法としては、常法に従うことができる。

【0049】形質転換体の培養は、公知の常法に従って行うことができる。培養温度としては、28℃~42℃が適当である。ラクトースオペロン(lac)のプロモーターを利用する場合は、菌体培養液の600nmの波長における吸光度がおよそ0.5になったところで、終濃度が1mM程度になるようにIPTGを加え発現誘導を行うことが必要である。

【0050】昆虫細胞としては、例えばInvitrogen社のバキュロウイルス発現マニュアルであるマックスバック(MAXBAC™; BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM MANUAL VERSION 1.4)に従い、このキットを使用する。この時、発現量を上げるためにポリヘドリンのプロモーターから開始コドンまでの距離を変えることが好ましい。

【0051】上記形質転換体を培養して得られるChM-ⅠⅠタンパク質は、公知の方法で宿主から単離・精製される。

【0052】大腸菌等の微生物、昆虫細胞、および動物

細胞で発現させて得られる該組換えポリペプチドは、例えばChM-11の一部配列を含む合成ペプチドに対するウサギ抗血清との免疫学的反応性によりChM-11であることが確認される。かかる方法としては、常法であるウェスタンブロッティング法が利用できる。

【0053】本発明のChM-11は、医薬組成物として、具体的には、軟骨細胞の増殖、軟骨細胞の分化機能の促進、さらに破骨細胞の増殖の促進等の作用により、骨折、各種軟骨疾患の予防または治療薬として有効である。

【0054】ChM-11の生理活性は例えば次のようにして測定される。軟骨細胞増殖活性の評価のための細胞取得、培養、および評価方法は鈴木らの方法[Method in Enzymology, Vol. 146, 313-320(1987)]に従って行う。すなわちウサギより成長肋軟骨を分離し、初代軟骨細胞を96穴プレートを用いて培養する。細胞がコンフルエントに達した後、約0.6から約200 ng/mlのChM-11および0.4 ng/mlの繊維芽細胞増殖因子を加え、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを測定する。0.4 ng/mlの繊維芽細胞増殖因子のみ添加時に比べChM-11を同時に加えた時の方が多量の放射性チミジンの取り込みがみられ、これはChM-11が強力な軟骨細胞の増殖促進効果を有することを示している。

【0055】破骨細胞の増殖促進は破骨細胞の象牙質への浸潤孔を指標に測定することができる。

【0056】本発明においては、軟骨細胞を増殖させる活性および軟骨細胞の分化機能を促進する活性さらに破骨細胞の増殖を促進する活性を生体に適用させるには、上記で得られたChM-11タンパク質の他に形質転換体の培養液、分離形質転換体、形質転換体処理物、固定化形質転換体、粗酵素液、酵素処理物等が用いられる。

【0057】このChM-11は特開平5-255398号公報にも記載されているように1 ng~100 μ g程度を骨折部位、軟骨疾患部位に、例えば外科手術用生体接着剤等の生体適合性担体に混合、含浸、塗布することによって投与する、または局所的に注入する、または静脈中、皮下等へ投与することにより、骨折、各種軟骨疾患の治療薬として用いることができる。生体適合性担体への混合、含浸、塗布、または注入用製剤等の調製はそれ自体既知の通常用いられる方法で行うことができる。

【0058】

【実施例】以下の実施例により、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り以下の実施例によって限定されるものではない。

【0059】<1>ChM-11 cDNAの部分断片のクローニング

(1) ウシ胎仔四肢骨端軟骨由来cDNAライブラリーの調製

【0060】PCR反応の鑄型に用いるcDNAを合成するために、ウシ胎仔四肢骨端軟骨RNAを調製した。

RNAの調製は、Chirgwinらの方法を若干変更して行った。すなわち、ウシ胎仔四肢骨端軟骨100 gを液体窒素中で粉碎し、グアニジンイソチオシアネート溶液[6 M グアニジンイソチオシアネート(和光純薬)、5 mM クエン酸ナトリウム(和光純薬)、0.1 M 2-メルカプトエタノール、0.5%ザルコシン酸ナトリウム(和光純薬)、pH 7.0]中でホモジナイズし

10 た。ホモジネート2.5 mlあたり1 gの塩化セシウム(和光純薬)を加え、溶解した。あらかじめ、ホモジネート25 mlに対して15 mlの塩化セシウム溶液(5.7 M塩化セシウム、0.1 M EDTA)を遠沈管に用意した。これに、ホモジネートを積層した。これを55,000 \times gで遠心分離してトータルRNAを沈澱として回収した。

【0061】回収したトータルRNAを滅菌脱塩水に溶解し、フェノール/クロロホルム抽出を行った。すなわち、トータルRNA溶液と等容量のフェノール(和光純薬)/クロロホルム(和光純薬)/イソアミルアルコール(和光純薬)混液(24対25対1、体積比)を混和し、15,000 \times g、10分間の遠心分離を行い、上清の水層を回収した。回収した水層と1/10容量の3 M酢酸ナトリウム(和光純薬)溶液を混和後、2倍容量のエタノールを添加して15,000 \times g、10分間の遠心分離を行い、エタノール沈澱によるトータルRNAの回収を行った。回収したトータルRNAを乾燥させた後、10 mlの滅菌脱塩水に溶解した。

【0062】poly(A) \cdot RNAの精製は、以下のように行った。すなわち、10 mgのトータルRNAを終濃度が1 mM EDTA、20 mM トリス塩酸(pH 7.5)になるように調製し、70 $^{\circ}$ C、5分間の熱処理後、氷上で急冷した。これに、5 M NaCl溶液を、終濃度が0.5 Mになるように加えて、Oligo(dT)セルロースカラム(type 7、1 \times 1 cm、Pharmacia社)に展開し、1 mM EDTAおよび0.5 M NaClを含む20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)でカラムを洗浄後、滅菌脱塩水にて結合分画を溶出して約100 μ gのpoly(A) \cdot RNAを得た。

【0063】cDNAの合成は、poly(A) \cdot RNA 10 μ gを鑄型に用いた。反応は、cDNA synthesis module (Amersham社)に添付された逆転写酵素、リボヌクレアーゼH、大腸菌DNAポリメラーゼにて、説明書に記載の方法で、二本鎖cDNAを合成した。次に、同じくcDNA synthesis module (Amersham社)に添付されたT4 DNAポリメラーゼにてcDNA末端の平滑化を行った。反応後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、上清の水層を回収した。回収した水層と等容量の5 M酢酸アンモニウム溶液を添加後、2倍容量のエタノールを混和した。次に、15,000 \times g、10

分間の遠心分離を行い、エタノール沈澱によるcDNAの回収を行った。回収したcDNAを乾燥した後、20 μ lの滅菌脱塩水に溶解した。

【0064】次に、10 μ lのcDNA (約2 μ g) を分取して、その末端にEcoRIアダプター (宝酒造) を付加した。すなわち、20 μ lのT4 DNAリガーゼ反応液「66 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)、6.6 mM MgCl₂ (和光純薬)、10 mM ジチオスレイトール (DTT、和光純薬)、66 μ M アデノシン5'-三リン酸 (ATP、SIGMA社)」中に350単位のT4 DNAリガーゼ (宝酒造) を加え、16°C、2時間インキュベーションして、200 pmolのEcoRIアダプターをcDNAの末端に結合した。

【0065】反応物を常法に従いSephacryl S-200カラム (1×4 cm) に展開し、1 mM EDTAと0.5 mM NaClを含む10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) にて、末端にEcoRIアダプターを付加したcDNAを溶出した。溶出したcDNAをエタノール沈澱で回収し、沈澱を乾燥後、2 μ lの滅菌脱塩水に溶解した。次に、あらかじめ制限酵素EcoRI (宝酒造) で消化後、末端を脱リン酸化した λ gt10ファージDNA (Clontech社) 1 μ gと、EcoRIアダプターを付加したcDNA 400 ngを、5 μ lのT4 DNAリガーゼ反応液中で、16°C、18時間インキュベーションしてT4 DNAリガーゼにて結合した。さらに、cDNAと結合した λ gt10ファージDNAをGigapack II Gold (Stratagene社) を用いてファージ粒子へパッケージングした。

【0066】得られたファージ粒子を常法に従い大腸菌C600 hflA株に感染、増幅を行い、ファージ粒子を回収した。一連の操作により、100 ngのcDNAあたり約200万のファージクローンを得た。回収されたファージ懸濁液の一部 (100万クローン相当) に、SDS (ナカライテスク)、EDTAがそれぞれ終濃度1%、10 mMになるように添加し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い、DNAを精製した。

【0067】(2) ChM-IIタンパク質をコードするcDNAのPCR法によるクローニング

上記のようにして得られたcDNAを鋳型に用い、ChM-IIタンパク質をコードするcDNAを、PCR法により増幅した。ファージ粒子から回収したDNA 5 ngを鋳型に反応液 {50 mM KCl (和光純薬)、10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3)、1.5 mM MgCl₂、0.1% (W/V) ゼラチン (Difco社)、0.2 mM 4 dNTP (東洋紡績)} 中で、0.5 μ lのTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造) にてcDNAの増幅反応を行った。その際、プライマーとしては、特開平5-255398号公報に記載のChM

-IIタンパク質のアミノ酸配列から推測し設計したプライマー、5'-CCITGGGCIATATITG (C/T) GC-3' (配列表の配列番号: 4、20ヌクレオチド、Iはイノシン) および5'-(A/G) TC(A/G) CA(A/G) TT(C/T) TCIAT(A/G) TGIAT(A/G) TG-3' (配列表の配列番号: 5、24ヌクレオチド) を、それぞれ終濃度0.2 mMになるように添加して、全量で100 μ lの反応液量とした。

【0068】合成DNAプライマーは、ABI 394 DNA合成機 (Applied Biosystems社) を用いて合成した。増幅反応は、94°C、10分間のインキュベーションの後、94°C、1分間 (変性ステップ)、50°C、1.5分間 (アニーリングステップ)、72°C、3分間 (伸長ステップ) のインキュベーションを30サイクル繰り返すことにより行った。最後に72°C、7分間のインキュベーションを行い、反応を終了した。反応後、反応液の1/10を5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ゲルを臭化エチジウム (Sigma社) で染色し、紫外線光 (UV) 下で解析した。

【0069】また、上記反応液のうち0.5 μ lを鋳型として用いて、2回目の増幅反応を行った。2回目の増幅反応は、1回目の増幅反応に準じて行った。プライマーとしては、一回目の増幅反応の際に用いたプライマーより内側に位置するプライマー、5'-TG(C/T) GA(C/T) GGICA(C/T) GGITG(C/T) G-3' (配列表の配列番号: 6、19ヌクレオチド) および5'-(C/T) TGIATICCGG(A/G) TAIAC(C/T) TT-3' (配列表の配列番号: 7、21ヌクレオチド) を用いた。反応は、94°C、10分間のインキュベーションの後、94°C、1分間、48°C、1.5分間、72°C、3分間のインキュベーションを30サイクル繰り返すことにより行った。最後に72°C、7分間のインキュベーションを行い、反応を終了した。

【0070】反応後、反応液の1/10を5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にて解析した。ゲルを臭化エチジウムで染色し、約200 bp付近のゲル断片をUV下で回収した。回収したゲルは、緩衝液 (0.25 M 酢酸アンモニウム、0.1% SDS、1 mM EDTA) 中でホモジナイズした。ホモジネートを37°Cで2時間振蕩し、フェノール/クロロホルム抽出を行い上清の水層を回収した。回収した水層に、等量の5 M 酢酸アンモニウムを添加した後、2倍容量のエタノールを添加し、10,000×g、10分間の遠心分離を行いcDNAを回収した。

【0071】次に、cDNAを乾燥した後、16 μ lの滅菌脱塩水に溶解し、T4 DNAポリメラーゼ緩衝液 [33 mM トリス酢酸緩衝液 (pH 7.9)、66 mM

M 酢酸カリウム (和光純薬)、10 mM 酢酸マグネシウム (和光純薬)、0.5 mM DTT、1 mM 4 dNTP] 中で6単位のT4 DNAポリメラーゼと、37℃、30分間反応させた。T4 DNAポリメラーゼにより末端を平滑化したcDNAをフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い精製した。精製したcDNAを乾燥後、20 μlの滅菌脱塩水に溶解した。次に、5 μlのcDNA溶液と、あらかじめ制限酵素Sma I (宝酒造) で消化後、脱リン酸化し、精製したプラスミドベクターpUC18 (宝酒造) 100 ngを、10 μlの反応液中でT4 DNAリガーゼにて16℃、12時間反応させることにより、プラスミドベクターpUC18のクローニング部位 (Sma I 部位) に挿入して結合した。

【0072】この反応液 3 μlを用いて、大腸菌JM109株のコンピテントセル (COMPETENT HIGH, 東洋紡績) を形質転換し、直径9 cmのシャーレ中の寒天培地に菌液を塗布し、培養した。この際、寒天培地としては、アンピシリン (Amp, 和光純薬) を終濃度50 μg/ml、5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (X-Gal, Sigma社) を終濃度0.004%、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG, Sigma社) を終濃度1 mMの濃度で含有した1.5% LB寒天培地 [1.5% 寒天 (和光純薬)、1% バクトトリプトン (Difco社)、0.5% 酵母抽出物 (Difco社)、0.5% NaCl] (以下、X-Gal-IPTG-LB-Amp寒天培地という) を用いた。培養は37℃で18時間行った。培養後、X-Gal-IPTG-LB-Amp寒天培地上に出現した耐性菌で、かつX-Galにより発色していない菌のコロニーを100個選択し、各々5 mlの、50 μg/mlのAmpを含むLB培地 (1% バクトトリプトン、0.5% 酵母抽出物、0.5% NaCl) 中で37℃、12時間、振盪培養した。

【0073】次に、常法に従い、菌体からプラスミドDNAを調製した。すなわち、菌体を10,000×g、10分間の遠心分離により培養液から回収した。回収した菌体を、培地の1/25容量の、1 mg/mlのリゾチーム (生化学工業) を含む溶液I [50 mM D (+)-グルコース (和光純薬)、25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、10 mM EDTA] に懸濁した。菌体懸濁液を氷上に10分間静置後、溶液Iの2倍容量の溶液II (1% SDS、0.2 N NaOH) を添加し、穏やかに混和後、氷上にさらに10分間静置した。次に、溶液Iの1.5倍容量の溶液III (60 mlの5 M酢酸カリウムに11.5 mlの酢酸と28.5 mlの滅菌脱塩水を混和した溶液) を添加し、氷上に15分間静置した。静置後、10,000×g、10分間の遠心分離により上清を回収し、上清の2/3容量のイソプロパノールを混和して、氷上にさらに10

分間静置した。静置後、10,000×g、10分間の遠心分離を行い、核酸を回収した。核酸を乾燥後、培地の1/25容量の、0.1 mg/mlのリボヌクレアーゼA (Sigma社) を含むTE緩衝液 [10 mM トリス (pH 7.5)、1 mM EDTA] に溶解し、37℃、30分間インキュベーションした。

【0074】インキュベーション後、等容量のポリエチレングリコール (PEG) 溶液 [20% PEG 6000 (和光純薬)、1.5 M NaCl] を混和し、ドライアイス上で30分間静置した。次に、15,000×g、15分間遠心分離を行い、プラスミドDNAを回収した。回収したプラスミドDNAを70% エタノールで2回洗浄し、乾燥後、培地の1/50容量のTE緩衝液に溶解し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い、プラスミドDNAを精製した。精製したプラスミドDNA 0.5 μgを制限酵素EcoRIで消化し、1% アガロース (岩井化学) ゲル電気泳動で解析した。その結果、約300 bpのcDNA断片を有する組換え体pCHM-2-1を得た。

【0075】(3) 塩基配列の決定

組換え体pCHM-2-1を40 mlのLB培地に播種し、37℃で15時間培養して調製した菌体培地から、常法に従いプラスミドDNAを調製した。調製したプラスミドDNAを用いて、ABI 373A シークエンサー (Applied Biosystems社) にてSanger法による塩基配列の決定を行った。なお、以下に行う塩基配列の決定は全て本法を用いて行った。

【0076】決定した塩基配列をもとに推定したアミノ酸配列は、精製ChM-IIタンパク質のアミノ酸配列 (特開平5-255398の配列番号14参照) の一部と一致した。

【0077】(4) 完全長ChM-II cDNAの取得 - 下流配列の取得 (3' - RACE法)

上記でpCHM-2-1のcDNA断片からプローブを調製し、PCR法でcDNAを増幅する際に鋳型として用いたウシ胎仔軟骨cDNAライブラリーをスクリーニングしたが、完全長cDNAを取得することはできなかった。そこで、完全長cDNAを取得する目的で以下のRapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法によるcDNAの増幅を行った。

【0078】RNAの調製は以下に行った。まず、推定4週齢 (体長4 cm) のウシ胎仔全組織約200 gを液体窒素中で粉碎し、200 mlのRNAzol溶液 (Tel-Test社) 中でホモジナイズした。次に、ホモジネートの1/10容量のクロロホルムを混和し、10,000×gで10分間遠心分離し、水層を回収した。水層と等容量のイソプロパノールを混和し、10,000×gで10分間遠心分離を行い、トータルRNAを回収した。回収したトータルRNAを乾燥させた後、10 mlの滅菌脱塩水に溶解した。約200 g

の組織から約200 mgのトータルRNAを抽出した。次に、常法に従いRNAの精製を行い、10 mgのトータルRNAから約100 μ gのpoly (A)⁺ RNAを得た。

【0079】得られたmRNAを鋳型に、MarathonTM cDNA Amplification kit (Clontech社)を用いて、RACE法によるcDNAの増幅を行った。以下の反応において、合成DNAプライマーは、MarathonTM cDNA Amplification kitに添付されたプライマー以外は、ABI 394 DNA合成機を用いて合成した。反応は、MarathonTM cDNA Amplification kitに添付された緩衝液およびdNTPを用いて行った。

【0080】まず、cDNAの合成を行った。精製したpoly (A)⁺ RNA 1 μ gとcDNA合成プライマー、5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTT(G/A/C)(G/A/C/T)-3' (配列表の配列番号: 8、52ヌクレオチド)を逆転写酵素にて37℃で処理し、第1鎖cDNAを合成した。第2鎖伸長反応、末端の平滑化を行い、cDNAの両端へアダプタープライマー、[5'-CTAATACGACT CACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3' (配列表の配列番号: 9、44ヌクレオチド)と5'-PO₄-ACCTGCCC-NH₂-3' (配列表の配列番号: 10、8ヌクレオチド)]の結合を行った。最終反応の反応液10 μ lを希釈し50 μ lとして、以後の増幅反応に1 μ lを用いた。

【0081】増幅反応は、ChM-II cDNAの配列の一部と相補的なプライマー、5'-TG TGGCC AGTACACGGC-3' (配列表の配列番号: 11、17ヌクレオチド)および3'末端に付加したアダプタープライマーと相補的なプライマー、5'-CCA TCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (配列表の配列番号: 12、27ヌクレオチド)を用い、Taq DNAポリメラーゼにて行った。反応液は、全量で50 μ lとした。反応は、94℃、1分間のインキュベーションの後、94℃、30秒間、60℃、30秒間、68℃、5分間のインキュベーションを30サイクル行い、最後に72℃、7分間のインキュベーションを行って反応を終了した。反応液の1/10を5% PAGEにて解析した。また、上記反応液のうち5 μ lを50倍希釈し、その5 μ lを用いて2回目の増幅反応を行った。

【0082】2回目の増幅反応は、1回目の増幅反応に準じて行った。希釈反応液5 μ lを鋳型に、1回目の増幅反応に用いたプライマーより内側に位置するプライマー、5'-AGTCTACCCCGGCATCCA-3' (配列表の配列番号: 13、18ヌクレオチド)および5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGC

GGC-3' (配列表の配列番号: 14、23ヌクレオチド)を用いて、Taq DNAポリメラーゼにて増幅反応を行った。反応液は、全量で50 μ lとした。反応は、94℃、1分間のインキュベーションの後、94℃、30秒間、60℃、30秒間、68℃、5分間のインキュベーションを30サイクル行い、最後に72℃、7分間のインキュベーションを行い反応を終了した。反応終了後、反応液の1/10を5% PAGEにて解析した。

【0083】次に、約200 bp付近に位置するゲル断片から、増幅したcDNA断片を回収、精製し、T4 DNAリガーゼにてプラスミドベクターpCRII (Invitrogen社)のクローニング部位に挿入して、大腸菌JM109株を形質転換した。X-Gal-IPTG-LB-Amp寒天培地上に出現した耐性菌で、かつX-Galにより発色していない3つの形質転換体について、常法に従いプラスミドDNAを調製し、解析を行った。さらに、調製したプラスミドDNAを用いて、cDNAの塩基配列を決定した。その結果、約200 bpの3'非翻訳領域の塩基配列を有するcDNA断片を持つ組換え体pCHM-2-3を得た。

【0084】(5)完全長ChM-II cDNAの取得-上流配列の取得(5'-RACE法)

5'-RACE法の反応は、3'-RACE法に準じて行った。合成DNAプライマーは、MarathonTM cDNA Amplification kitに添付されたプライマー以外はABI 394 DNA合成機を用いて合成した。反応は、MarathonTM cDNA Amplification kitに添付された緩衝液およびdNTPを用いた。鋳型としては、3'-RACE法の反応と同じく、両端にアダプタープライマーを付加したcDNAを用いた。1回目の増幅反応は、3'-RACE法で決定したChM-II cDNAの3'非翻訳領域の配列を基に設計したプライマー、5'-AGATCGGCTTGTICCTCCAT-3' (配列表の配列番号: 15、20ヌクレオチド)および3'末端に付加したアダプタープライマーと相補的な、3'-RACE法の反応の際にも用いたプライマー、5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (配列表の配列番号: 12、27ヌクレオチド)を用いた。

反応液は全量を50 μ lとして、Taq DNAポリメラーゼにて増幅反応を行った。反応は、94℃、1分間のインキュベーションの後、94℃、30秒間、60℃、30秒間、68℃、5分間のインキュベーションを30サイクル行い、最後に72℃、7分間のインキュベーションを行って反応を終了した。反応後、反応液の1/10を5% PAGEにて解析した。また、上記反応液のうち5 μ lを50倍希釈し、その5 μ lを鋳型として用いて、2回目の増幅反応を行った。

【0085】2回目の増幅反応は、1回目の増幅反応に準じて行った。プライマーとしては、1回目の増幅反応

に用いたプライマーより内側に位置するプライマー、
5'-AGAAGATGGCTGTCITTTTAGA
-3' (配列表の配列番号: 16、22ヌクレオチド)
および5'-ACTCACTATAGGGCTCGAG
CGGC-3' (配列表の配列番号: 17、23ヌクレ
オチド)を用いて行った。反応は、94℃、1分間のイン
キュベーションの後、94℃、30秒間、60℃、3
0秒間、68℃、5分間のインキュベーションを30サ
イクル行い、最後に72℃、7分間のインキュベーション
を行って反応を終了した。反応後、反応液の1/10
を5%PAGEにて解析した。次に、約500bp付近
に位置するゲル断片から、増幅したcDNAを回収、精
製し、プラスミドベクターpCRIIのクローニング部
位に挿入して、大腸菌JM109株を形質転換した。X-
Gal-IPTG-LB-Amp寒天培地上に出現した
耐性菌で、かつX-Galにより発色していない3つ
の形質転換体について、常法に従い、プラスミドDNA
を調製した。次に、調製したプラスミドDNAを用い
て、解析を行い、さらに、塩基配列の決定を行った。その
結果、約500bpのChM-II全コーディング領域と5'
非翻訳領域の配列を有するcDNA断片を持つ
組換え体pCHM-2-5を得た。

【0086】pCHM-2-5の塩基配列を決定した結
果、翻訳開始コドンATG(Met)の存在を確認する
とともに、ATG(Met)の下流にChM-II配列
を確認した。pCHM-2-1、pCHM-2-3、p
CHM-2-5の配列から、配列表の配列番号1に記載
の塩基配列の解明に成功し、本発明のChM-II遺伝
子の取得に至った。その結果、シグナルペプチドを含む
ChM-IIの全アミノ酸配列は、配列表の配列番号2
に示される配列であることが確認された。

【0087】<2>組換えChM-IIの製造

次に、ChM-II cDNAを大腸菌で発現させるこ
とにより組換えChM-IIの取得を試み、さらに、組
換えChM-IIの生物活性を検定した。

【0088】(1)ChM-II cDNAの改変

発現プラスミドベクターpPROEX-1(Gibco

BRL社)のプロモーターの下流にChM-II c
DNAを挿入するため、プライマー、5'-GGCGC
TCGAATTCAAATTGAAGGTGGACCT
TGGGCT-3' (配列表の配列番号: 18、36ヌ
クレオチド)および5'-CCTGGATCCTATA
GGTAGACAGTA-3' (配列表の配列番号: 1
9、24ヌクレオチド)の2つのプライマーを用い、P
CR法にて塩基配列の改変を行った。ChM-II c
DNAのコーディング領域の全長を有するプラスミド、
pCHM-2-5 DNAを鋳型に、Taq DNAポリ
メラーゼにて増幅反応を行った。反応は、94℃、10
分間のインキュベーションの後、94℃、1分間、55
℃、1.5分間、72℃、2分間のインキュベーション

を30サイクルと72℃、7分間のインキュベーション
を行い反応を終了した。

【0089】次に、改変したcDNAを常法に従い、プ
ラスミドベクターpCRIIのクローニング部位に挿入
した。これをpCRII-CHM-IIと命名した。挿
入したcDNAの塩基配列を決定し、塩基の置換による
コードされるアミノ酸の変異がないことを確認した後、
制限酵素EcoRIとBamHI(宝酒造)でpCRII-
CHM-II DNAを消化して1%アガロースゲ
ルで電気泳動を行い、改変したcDNAをアガロースゲ
ルから回収した。次に、回収したcDNAを、あらかじめ
制限酵素EcoRIとBamHIにて消化した発現プ
ラスミドベクターpPROEX-1のクローニング部位
に挿入し、大腸菌JM109株を形質転換した。この時
用いたプライマー11には、血液凝固系プロテアーゼ第
10因子の切断配列が含まれるよう設計した。また、p
PROEX-1のEcoRIとBamHIの間に挿入し
たChM-II cDNAは、発現プロモーターの下流
に存在するプラスミドベクター自身の翻訳開始コドンA
TG(Met)を利用して翻訳されるように設計した。
発現プラスミドベクターpPROEX-1は、翻訳開始
コドンの3塩基下流にヒスチジンタグを有しているた
め、発現後にヒスチジンタグを利用して発現蛋白質を精
製しうることが期待される。このようにして、ChM-
II cDNAを発現するプラスミドベクターpPRO
EX-CHM-IIを構築した。このようにして構築し
た発現ベクターにより、配列表の配列番号3に記載の組
換え蛋白質が発現されることが期待された。

【0090】(2)組換えChM-IIの精製

達するまで37℃で培養した。次に、終濃度1mMにな
るようにIPTGを添加し発現を誘導した。IPTGを
添加した後、培養を4時間継続した。発現を誘導した7
50mlの菌体を、10,000×g、10分間の遠心
分離により集菌し、20mlの結合緩衝液[5mMイ
ミダゾール(和光純薬)、0.5M NaCl、20m
M トリス塩酸緩衝液(pH7.9)]に懸濁した。ソ
ニケーションによる菌体破碎、10,000×g、15
分間の遠心分離、20mlの結合緩衝液への再懸濁を3
回繰り返す、3回目の遠心分離後の沈澱を35mlの6
Mグアニジン塩酸を含む結合緩衝液に溶解し、このうち
20mlをヒスチジン結合カラム(1×2cm、Novage
n社)に展開した。

【0091】素通り画分、15mlの6Mグアニジン塩
酸を含む結合緩衝液による洗浄画分、6mlの6Mグア
ニジン塩酸を含む希釈洗浄緩衝液[20mMイミダゾ
ール、0.5M NaCl、20mMトリス塩酸緩衝液
(pH7.9)]による洗浄画分を回収した。次に、イ
ミダゾール濃度のステップワイズ法で溶出を行いイミダ
ゾール濃度60mM、0.1M、1Mで溶出した画分
をそれぞれ2ml、1ml、2mlを回収した。最後

に、イミダゾール濃度1Mの溶出を再び行い、溶出画分を2ml回収した。

【0092】(3) 第10因子によるChM-11からのヒスチジntagの切断

ヒスチジン結合カラムクロマトグラフィーで精製した各標品をPD-10カラムに展開して脱塩を行った。脱塩後、各標品より10μlを採取し、15% SDS-PAGEにて解析し、組換えChM-11の溶出を確認した。一方、1Mイミダゾール濃度で溶出した画分については、脱塩を行った後に、蛋白質の定量を行い、総蛋白質量10μgあたり12μgの第10因子(DENZYME ApS社)と反応液[0.1M NaCl、20mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)] 100μl中で37℃、2時間反応し、ヒスチジntagを切断した。反応液から10μlを分取し、15% SDS-PAGEで解析した。泳動後、ゲルをCoomassie Brilliant Blue R (CBB, Sigma社)で染色し、ChM-11タンパク質のバンドを確認した。

【0093】(4) 組換えChM-11の生物活性
まず、幼若なニュージーランドウサギ(300-600g、日本チャールズリバー社)の肋軟骨・骨移行部より成長板軟骨を採取し、メスで細切した。次に、この組織を0.1%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA和光純薬)を含むカルシウムイオンやマグネシウムイオンを含まない平衡塩緩衝液(CMF)中、37℃で20分間インキュベーションした。その後、組織の10倍容量の0.2%トリプシン(Difco Laboratories社)を含むCMF中で1時間処理した。CMFで組織を洗浄した後、10倍容量の0.2%コラゲナーゼ(Sigma社)を含むCMF中で37℃、2時間30分間、攪拌して組織を分散した。分離した細胞を120μm孔径のナイロンフィルター(NBC工業)でふるいにかけ、分離された細胞を遠心分離により回収した。回収した細胞を10%ウシ胎仔血清(FBS、GIBCO社)を含むEagle最少基本培地(MEM)で3回洗浄後、1型コラーゲン溶液(50μg/ml、pH3.0;高研)にてコートした直径6mmの96穴マルチウェルプレート(Nunc社)に10000細胞/mlとなるよう播種して、10%FBS、32U/mlのペニシリン(明治製薬)、40μg/mlのストレプトマイシン(Sigma社)を含む、F-12培地とDulbecco改変Eagle培地(DMEM)の1:1混合培地中で(FAD培地、Flow Laboratories社)37℃、5%炭酸ガス濃度を含む気相下にて培養した。培地交換は1日おきに行い、ウェルあたり100μlの培地を用いた。

【0094】培養軟骨細胞のDNA合成は細胞の酸不溶画分への³Hチミジン(Amersham社)の取り込みを指標として測定した。すなわち、上記細胞が96穴培養プレート中でコンフルエントに達した後、細胞を0.3%FBSを含むFAD培地に交換し、37℃で24時間

培養した。次に、測定する試料(上記(3)項で得られた組換えChM-11)と0.3%FBSを含むFAD培地に交換しさらに22時間培養した。この場合FGF-2を0.4ng/mlの濃度で添加、非添加の両方を検討した。さらに10μlの³Hチミジン(130μCi/ml)を加え、4時間培養した後、細胞を氷冷したPBS(20mMリン酸緩衝液(pH7.0)、0.15M NaCl)で3回洗浄した後、5%トリクロロ酢酸(TCA和光純薬)で2回、エタノール/エーテル(3/1、V/V)で2回洗浄して遊離の放射活性を除去した。さらに細胞層を0.1N水酸化ナトリウムに溶解して回収し、これを6N塩酸で中和した後、DNAに取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンター(LKB-Wallac 1215 CompuGamma、LKB-Wallac社)で測定した。その結果、組換えChM-11が軟骨細胞を増殖させる活性を有することが示された。

【0095】

【発明の効果】本発明のChM-11遺伝子は新規な遺伝子であり、それを用いることにより組換えChM-11を安定に供給することができる。ChM-11は、軟骨細胞を増殖させる活性、分化機能を促進する活性を有することから、医薬品としての利用が期待される。

【0096】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 715

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

起源

生物名: ウシ(Bos taurus)

直接の起源

クローン名: pCHM-2-1、pCHM-2-3、pCHM-2-5

配列の特徴

特徴を表す記号: mat_peptide

存在位置: 187..585

特徴を決定した方法: E

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 133..585

特徴を決定した方法: E

配列の特徴

特徴を表す記号: siq_peptide

存在位置: 133..186

特徴を決定した方法: E

配列の特徴:

特徴を表す記号:

存在位置:

特徴を決定した方法:

その他の情報: Nはイノシンを表す。

25	26
配列	
AAGATATGAG AGATGCAGAA TTCTAAGGTT AAATAGCTAG ATAATACTAA TTCAGACTCG	60
AATATTCTTC ACACAGTGTG TGGCGGCAAG CCTAAGGGTC AAGGAAGAAG CATTCTAGAG	120
AGACAAAGAC AA ATG TTT TCC ACA GGA ACC CTC CTT CTG GCT GCT CTG	168
Met Phe Ser Thr Gly Thr Leu Leu Leu Ala Ala Leu	
-18 -15 -10	
ATT TCA CCT GCA CTG GCT GGA CCA TGG GCT ATT ATA TGT GCT GGC AAG	216
Ile Ser Pro Ala Leu Ala Gly Pro Trp Ala Ile Ile Cys Ala Gly Lys	
-5 1 5 10	
TCT TCC AAT GAG ATC AGG ACA TGT GAT GGC CAT GGC TGT GGC CAG TAC	264
Ser Ser Asn Glu Ile Arg Thr Cys Asp Gly His Gly Cys Gly Gln Tyr	
15 20 25	
ACG GCT CAG AGA AAT CAG AAG CTT CAC CAG GGT GTA GAT GTC TTG TCC	312
Thr Ala Gln Arg Asn Gln Lys Leu His Gln Gly Val Asp Val Leu Cys	
30 35 40	
TCA GAT GGC TCT ACT GTT TAC GCA CCT TTC ACC GGA AAG ATC ATG GGC	360
Ser Asp Gly Ser Thr Val Tyr Ala Pro Phe Thr Gly Lys Ile Met Gly	
45 50 55	
CAG GAG AAA CCT TAT AAA AAC AAA AAT GCC ATC AAT AAT GGT GTT CGG	408
Gln Glu Lys Pro Tyr Lys Asn Lys Asn Ala Ile Asn Asn Gly Val Arg	
60 65 70	
ATC TCT GGA GGA GGT TTC TCC ATT AAA ATG TTC TAC ATC AAG CCA ATT	456
Ile Ser Gly Gly Gly Phe Cys Ile Lys Met Phe Tyr Ile Lys Pro Ile	
75 80 85 90	
AAA TAT AAA GGT TCT ATC AAG AAG GGA GAA AAA CTG GGC ACT CTG CTG	504
Lys Tyr Lys Gly Ser Ile Lys Lys Gly Glu Lys Leu Gly Thr Leu Leu	
95 100 105	
CCC TTG CAA AAA GTT TAC CCT CGA ATA CAA TCC CAC ATA CAT ATT GAA	552
Pro Leu Gln Lys Val Tyr Pro Gly Ile Gln Ser His Ile His Ile Glu	
110 115 120	
AAC TGT GAC TTG AGT GAT CCT ACT GTC TAC CTA TAGATCGAGG ACAAGCCGAT	605
Asn Cys Asp Leu Ser Asp Pro Thr Val Tyr Leu	
125 130	
CTTCTAAAA GNCAGCCATC TTCTTCAAAC CTAGGCACCT ATCCTGCTTT TCACAAATTT	665
GAGCTCAAAAT AGAAACATGA TGAATGAAAG AGAGTAAAAA AAAAAAAAAA	715

【0097】配列番号：2

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：151

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

*

配列

Met Phe Ser Thr Gly Thr Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ile Ser Pro Ala	
-18 -15 -10 -5	
Leu Ala Gly Pro Trp Ala Ile Ile Cys Ala Gly Lys Ser Ser Asn Glu	
1 5 10	
Ile Arg Thr Cys Asp Gly His Gly Cys Gly Gln Tyr Thr Ala Gln Arg	
15 20 25 30	
Asn Gln Lys Leu His Gln Gly Val Asp Val Leu Cys Ser Asp Gly Ser	
35 40 45	
Thr Val Tyr Ala Pro Phe Thr Gly Lys Ile Met Gly Gln Glu Lys Pro	
50 55 60	
Tyr Lys Asn Lys Asn Ala Ile Asn Asn Gly Val Arg Ile Ser Gly Gly	

(15)

特開平10-146189

27 65 70 75 28

Gly Phe Cys Ile Lys Met Phe Tyr Ile Lys Pro Ile Lys Tyr Lys Gly

80 85 90

Ser Ile Lys Lys Gly Glu Lys Leu Gly Thr Leu Leu Pro Leu Gln Lys

95 100 105 110

Val Tyr Pro Gly Ile Gln Ser His Ile His Ile Glu Asn Cys Asp Leu

115 120 125

Ser Asp Pro Thr Val Tyr Leu

130

【0098】配列番号：3

配列の長さ：165

配列の型：アミノ酸

10* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

配列

Met Gly His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr Glu

1 5 10 15

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala His Met Gly Ile Gln Ile Glu Gly Arg

20 25 30

Gly Pro Trp Ala Ile Ile Cys Ala Gly Lys Ser Ser Asn Glu Ile Arg

35 40 45

Thr Cys Asp Gly His Gly Cys Gly Gln Tyr Thr Ala Gln Arg Asn Gln

50 55 60

Lys Leu His Gln Gly Val Asp Val Leu Cys Ser Asp Gly Ser Thr Val

65 70 75 80

Tyr Ala Pro Phe Thr Gly Lys Ile Met Gly Gln Glu Lys Pro Tyr Lys

85 90 95

Asn Lys Asn Ala Ile Asn Asn Gly Val Arg Ile Ser Gly Gly Gly Phe

100 105 110

Cys Ile Lys Met Phe Tyr Ile Lys Pro Ile Lys Tyr Lys Gly Ser Ile

115 120 125

Lys Lys Gly Glu Lys Leu Gly Thr Leu Leu Pro Leu Gln Lys Val Tyr

130 135 140

Pro Gly Ile Gln Ser His Ile His Ile Glu Asn Cys Asp Leu Ser Asp

145 150 155 160

Pro Thr Val Tyr Leu

165

【0099】配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

※ 配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

40 その他の情報：Nはイノシンを表す。

※

配列

CCNTGGCCNA TNATNTGYCC

20

【0100】配列番号：5

配列の長さ：24

配列の型：核酸

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

RTCRCAITTY TCIATRTGIA TRTG

24

【0101】配列番号：6

配列の長さ：19

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列の特徴：
特徴を表す記号：

配列

TGYGAYGGNC AYGGNTGYG

【0102】配列番号：7

配列の長さ：21
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

YTGATNCCN GGRTANACYT T

【0103】配列番号：8

配列の長さ：52
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTCTAGAATT CAGCGCCCGC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT VN

【0104】配列番号：9

配列の長さ：44
配列の型：核酸

配列

CTAATACGAC TCACTATAGG GCTCGAGCGG CCGCCCGCGC AGGT

【0105】配列番号：10

配列の長さ：8
配列の型：核酸

配列

ACCTGCCC

【0106】配列番号：11

配列の長さ：17
配列の型：核酸

配列

TGTGGCCAGT ACACGGC

【0107】配列番号：12

配列の長さ：27
配列の型：核酸

配列

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

【0108】配列番号：13

配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列

AGTCTACCCC GGCATCCA

【0109】配列番号：14

配列の長さ：23
配列の型：核酸

* 存在位置：
特徴を決定した方法：
その他の情報：Nはイノシンを表す。

※

※ 配列の特徴：
特徴を表す記号：
存在位置：
10 特徴を決定した方法：
その他の情報：Nはイノシンを表す。

※

★ 配列の特徴：
特徴を表す記号：
存在位置：
特徴を決定した方法：
その他の情報：NはG、A、CまたはTを表す。

★20

☆ 鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆

◆ 鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
◆ 30 配列の種類：他の核酸 合成DNA

◆

* 鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

*

※ 鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 40 配列の種類：他の核酸 合成DNA

※

★ 鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

★

鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
50 配列の種類：他の核酸 合成DNA

50

配列

ACTCACTATA GGGCTCGACC GGC

【0110】配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGATCGGCTT GTNCCTCCAT

【0111】配列番号：16

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGAAGATGGC TGTCTTTTA GA

【0112】配列番号：17

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列

ACTCACTATA GGGCTCGACC GGC

【0113】配列番号：18

配列の長さ：36

配列の型：核酸

配列

GGCGCTCGAA TTCAAATTGA AGGTGGACCT TCGGCT

【0114】配列番号：19

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

CCTGGATCCT ATAGGTAGA CAGTA

※ 配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nはイノシンを表す。

*

※ 配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nはイノシンを表す。

※

★ 鎖の数：一本鎖

20 トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

◆ 鎖の数：一本鎖

30 トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

//C12N 1/21

C12R 1:19)

(C12P 21/02

C12R 1:19)

(72)発明者 近藤 淳

神奈川県横浜市青葉区鶴志田町1000番地

三菱化学株式会社横浜総合研究所内